



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/11, C07K 14/135		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/14409
			(43) Date de publication internationale: 17 mai 1996 (17.05.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01464 (22) Date de dépôt international: 7 novembre 1995 (07.11.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/13307 7 novembre 1994 (07.11.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel-Gance, F-92100 Boulogne (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): NGUYEN NGOC, Thien [FR/FR]; 7, les Petits Hutin, lathoy, F-74160 Saint-Julien-en-Genevois (FR). BINZ, Hans [CH/FR]; Les Crêtes, F-74160 Beaumont (FR). UHLEN, Mathias [SE/SE]; Surbrunnsgatan 7, S-104 05 Stockholm (SE). STAHL, Stefan [SE/SE]; Torphagsvägen 8, S-104 05 Stockholm (SE). NYGREN, Per, Ake [SE/SE]; Pilotgatan 22, S-128 32 Skarpnack (SE). (74) Mandataire: MARTIN, Jean-Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.	

(54) Title: PRODUCTION OF RECOMBINANT PEPTIDES AS NATURAL HYDROPHOBIC PEPTIDE ANALOGUES

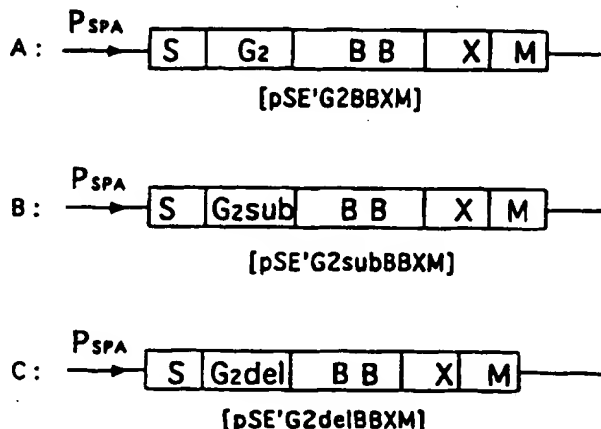
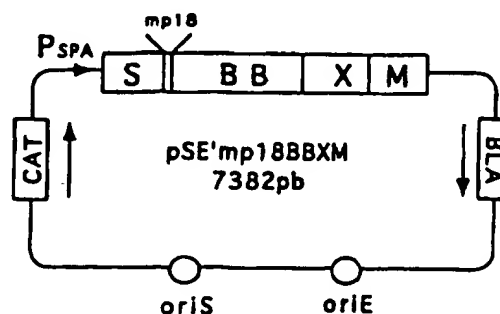
(54) Titre: PRODUCTION DE PEPTIDES RECOMBINANTS, ANALOGUES DE PEPTIDES NATURELS HYDROPHOBES

(57) Abstract

A method for secreting a biologically active recombinant peptide as an analogue of a natural peptide having at least one hydrophobic region, by culturing cells transformed by a nucleic acid construct comprising elements for the expression and secretion of said peptide by the cell, and a sequence coding for a peptide with an amino acid sequence that differs from the natural peptide sequence in that it has at least one modification in a non-transmembrane hydrophobic region of the peptide; and by recovering the peptide and/or cells carrying said recombinant peptide. The resulting recombinant peptide, a corresponding DNA sequence, and a bacterium containing same, are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de sécrétion d'un peptide recombinant biologiquement actif, analogue d'un peptide naturel présentant au moins une région hydrophobe, caractérisé en ce qu'on cultive des cellules transformées par une construction d'acides nucléiques comportant des éléments assurant l'expression et la sécrétion dudit peptide par la cellule, et une séquence codant pour un peptide dont la séquence en acides aminés diffère de la séquence du peptide naturel par au moins une modification dans une région hydrophobe non transmembranaire du peptide, et en ce que l'on récupère le peptide et/ou les cellules portant ledit peptide recombinant. L'invention concerne également un peptide recombinant susceptible d'être ainsi obtenu, une séquence d'ADN correspondante et une bactérie la contenant.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PRODUCTION DE PEPTIDES RECOMBINANTS ANALOGUES DE PEPTIDES NATURELS HYDROPHOBES

La présente invention se rapporte à des peptides recombinants, analogues de peptides naturels, et ayant conservé l'activité biologique de ces peptides naturels. Ces peptides peuvent être exprimés par différents types de cellules et leur production est améliorée par rapport à celle du peptide naturel.

Par peptide on entend toute substance composée d'un enchaînement d'acides aminés, c'est-à-dire oligopeptide, polypeptide et protéine.

Les peptides possèdent une grande variété de propriétés biologiques, et pour éviter les problèmes notamment de contamination liés aux techniques de purification à partir de produits biologiques, on a été amené à les produire par génie génétique.

Toutefois, la production de peptides par voie recombinante se heurte à des difficultés liées au système d'expression et à la cellule hôte. En effet, pour faciliter leur récupération, il est souhaitable que les peptides soient excrétés à travers la membrane cellulaire, afin de les obtenir dans le milieu extracellulaire ou, dans le cas de bactérie Gram négatif, dans l'espace périplasmique. On peut introduire dans une cellule, en particulier une bactérie, un système permettant l'expression du peptide sous forme fusionnée avec une séquence d'ancrage membranaire, de manière à obtenir le produit de fusion lié de manière covalente, à la surface membranaire.

C'est ainsi que dans le cadre de la préparation de vaccin contre le VRS, les demandeurs ont mis au point un procédé de technique d'ADN recombinant permettant de modifier ponctuellement par mutagenèse dirigée, des nucléotides dans un gène codant pour une séquence polypeptidique, utile notamment pour l'obtention de vaccins par voie orale contre le virus respiratoire syncytial (VRS).

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est la cause la plus fréquente de maladies respiratoires chez le nouveau-né : bronchopneumopathies (bronchiolites). L'OMS estime chaque année 50 millions de cas atteints du VRS, dont 160 000 décès dans le monde entier. Il existe deux sous groupes du virus (sous groupes A et B).

Le VRS est classé dans la famille des Paramyxoviridae, genre pneumovirus comportant un génome ARN non segmenté, de polarité négative, codant pour 10 protéines spécifiques.

Il n'existe pas actuellement de vaccin disponible, contre le VRS. Les vaccins à virus inactivé se sont montrés inefficaces et ont même parfois aggravé les infections des nourrissons. Dans les années 60, les tentatives de vaccination avec le VRS inactivé à la formaline ont conduit à l'échec :
5 au lieu de conférer une protection lors de la réinfection due au VRS, le vaccin a eu pour effet d'aggraver la maladie chez l'enfant.

La demande WO 87/04185 a proposé d'utiliser des protéines structurales du VRS en vue d'un vaccin, comme les protéines d'enveloppe appelées protéine F (protéine de fusion) ou protéine G, une glycoprotéine
10 de 22 Kd, une protéine de 9,5 Kd, ou la protéine majeure de capsid (protéine N).

La demande WO 89/02935 décrit les propriétés de protection de la protéine F entière du VRS, éventuellement modifiée sous forme monomérique ou désacétylée.

15 Une série de fragments de la protéine F a été clonée en vue de rechercher leurs propriétés neutralisantes.

Toutefois les vaccins immunitaires testés à ce jour se sont montrés inefficaces ou ont induit une pathologie pulmonaire (bronchiolite ou péribronchite).

20 A l'heure actuelle il n'existe pas de traitement de fond des infections dues au VRS.

Les infections au VRS des voies aériennes supérieures : le traitement repose essentiellement sur les médications symptomatiques identiques à celles des autres infections virales.

25 Les infections au VRS des voies aériennes inférieures : le traitement chez les nourrissons repose sur le maintien d'une hydratation correcte, l'aspiration des sécrétions et l'administration d'oxygène si besoin. Un effet positif a été observé avec la ribavirine, nucléotide actif in vitro contre le VRS.

30 Afin de faciliter l'administration du vaccin, il serait souhaitable de disposer d'un produit actif par voie orale, générant une bonne immunité, avec des effets secondaires réduits.

Les demandeurs ont construit un système vecteur original, appelé encore vecteur navette, qui est fonctionnel dans *Escherichia coli* et *Staphylococcus xylosus* : le vecteur renferme un signal séquence de sécrétion S, et une région XM d'ancrage membranaire d'origine de la protéine A du *Staphylococcus aureus*, avec un site de clonage entre S et XM
5 permettant d'insérer un ou plusieurs gènes.

Afin de faciliter le passage transmembranaire du peptide, l'hydrophobicité de la molécule doit dans certains cas être modifiée. Cependant, ces modifications ne doivent pas altérer les propriétés
10 biologiques, notamment immunogènes du produit.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un procédé de production d'un peptide recombinant biologiquement actif, analogue d'un peptide naturel présentant au moins une région hydrophobe, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on introduit dans une cellule
15 une construction d'ADN, codant pour un peptide dont la séquence d'acides aminés diffère de la séquence du peptide naturel par au moins une modification dans ladite région hydrophobe, et comportant des éléments assurant l'expression et la sécrétion dudit peptide par la cellule, et en ce que, après culture des cellules, on récupère le peptide et/ou les
20 cellules portant ledit peptide recombinant.

De préférence, la séquence d'acides aminés est modifiée au moins dans une région différente de la région transmembranaire du peptide naturel.

La modification devra de préférence intervenir dans une région
25 non essentielle pour l'activité biologique d'intérêt du peptide, qui doit être maintenue.

Ce procédé met en jeu une construction d'ADN recombinant dans laquelle une séquence signal de sécrétion fonctionnelle est liée à un gène de structure qui a été altéré afin de modifier la structure qui permette au produit recombinant de traverser la membrane de la cellule hôte, alors
30 que le produit recombinant du gène de structure d'origine ne l'est pas quant il est lié à la même séquence signal de sécrétion ; et les modifications structurelles du produit recombinant devraient être réalisées par génie génétique en altérant la localisation du produit recombinant exprimé dans
35 une cellule hôte.

Les modifications, selon un aspect de l'invention, visent à modifier l'hydrophobicité du produit recombinant.

L'invention a donc pour objet un procédé de production de peptide recombinant dans lequel les modifications structurales du gène conduisent à un peptide dans lequel au moins un acide aminé hydrophobe de la séquence du peptide naturel est remplacé par un acide aminé non hydrophobe. Dans un autre mode de réalisation dans le peptide recombinant, au moins un acide aminé hydrophobe est délété de la séquence du peptide naturel.

10 Avantageusement, l'acide aminé hydrophobe est choisi dans le groupe suivant : Tryptophane, Phénylalanine, Proline, Valine, Alanine, Isoleucine, Leucine et Méthionine.

Les modifications structurales du gène peuvent être faites par insertion de nucléotides, ou par délétion de nucléotides.

15 Les constructions dans lesquelles les modifications structurales du gène sont faites par substitution de nucléotides par mutagénèse dirigée sont également comprises dans l'invention.

Les modifications structurales du gène pourront changer la localisation de telle manière que le produit recombinant soit exposé à la surface membranaire de la cellule par une liaison covalente à la partie d'ancrage membranaire.

20 Dans un autre mode de mise en oeuvre, les modifications structurales du gène peuvent changer la localisation de telle manière que le produit recombinant soit sécrété dans le milieu de culture.

25 L'invention a donc également pour objet la construction d'ADN qui comprend une séquence signal de sécrétion liée de manière opérationnelle à la séquence d'ADN codant pour le peptide recombinant, et assurant la translocation dudit peptide et sa sécrétion extracellulaire.

Selon un autre aspect, l'invention se rapporte à un procédé caractérisé en ce que la construction d'ADN comprend une séquence signal liée de manière opérationnelle à la séquence d'ADN codant pour ledit peptide et permettant la translocation du peptide à travers la membrane de la cellule hôte et son ancrage membranaire.

30

Des peptides recombinants susceptibles d'être obtenus par le procédé caractérisés en ce qu'ils diffèrent du peptide naturel par au moins une modification dans la région hydrophobe du peptide naturel sont un autre des objets de l'invention. Ils peuvent se présenter ancrés à la surface de la cellule hôte. Ces peptides seront notamment choisis parmi les analogues d'une protéine de structure du VRS ou d'un fragment d'une telle protéine ; plus particulièrement, le peptide recombinant comprend une séquence analogue de la protéine G du VRS, sous groupe A ou B, notamment comprise entre les résidus 130 et 230 de la protéine G du VRS en présentant au moins 80 % d'homologie.

La protéine G est une glycoprotéine d'enveloppe du VRS, de poids moléculaire compris entre 84 et 90 Kd, pauvre en méthionine. La séquence de la protéine G diffère pour les sous-groupes A et B du VRS ; les termes "séquence de la protéine G" lorsqu'ils sont employés dans la présente demande, doivent s'entendre comme se référant à la fois à la séquence du sous-groupe A ou du sous-groupe B, lorsque cela n'est pas précisé différemment.

La Demanderesse a mis en évidence que la séquence comprise entre les acides aminés 130 et 230 de la protéine G naturelle est particulièrement appropriée pour induire une protection efficace contre l'infection par le VRS, sous-groupes A et B, sans induire les pathologies observées avec les vaccins basés sur le virus entier inactivé par le formol, ou observées avec les protéines F et G entières.

Les moyens permettant l'expression du polypeptide sont connus de l'homme du métier et sont adaptés en fonction de la bactérie utilisée.

De préférence, la séquence d'ADN est introduite sous forme d'un plasmide, tel qu'un plasmide navette.

Les protéines du VRS ont été à ce jour exprimées dans différents systèmes d'expression comme le virus de la vaccine, les baculovirus ou les adénovirus. Cependant, des problèmes potentiels sont associés à la présence de particules virales résiduelles.

Dans un de ses modes de mise en oeuvre, le procédé selon la présente invention utilise une bactérie commensale de l'homme, apathogène et comestible. En particulier, la bactérie peut appartenir au genre *Staphylococcus*. *Staphylococcus xylosus* qui est une bactérie utilisée dans
5 l'industrie alimentaire depuis de nombreuses années, et peut être administrée, vivante, par voie orale. Des systèmes d'expression d'épitopes hétérologues à la surface de *S. xylosus* ont été notamment décrits par N'guyen et al dans Gene, 1993, 128 : 89-94.

De préférence, le polypeptide hétérologue est exprimé à la surface
10 de la membrane de la bactérie, sous une conformation essentiellement identique à celle de l'épitope correspondant de la protéine G naturelle.

La présentation de la protéine recombinante à la surface membranaire de la bactérie dépend de sa nature chimique et de son enchaînement peptidique.

15 On peut utiliser la séquence naturelle de la protéine G du VRS et introduire une séquence d'ADN codant pour un peptide comportant la séquence ID n° 1 ou la séquence ID n° 2.

Selon un aspect de l'invention, dans la séquence correspondant à la séquence comprise entre les acides aminés 130 et 230 de la protéine G,
20 l'acide aminé cystéine en positions 173 et/ou 186 a été remplacé par un acide aminé ne formant pas de pont disulfure, en particulier la sérine.

Une telle mutation favorise la formation du pont disulfure entre les résidus cystéine restant en positions 176 et 182, qui est critique pour l'immunogénicité de la séquence ; elle évite la formation de ponts
25 disulfures désordonnés.

Des peptides utiles pour la mise en oeuvre d'un tel procédé sont ceux comportant notamment l'une des séquences ID n° 3 ou ID n° 4.

Selon un autre aspect de l'invention dans la séquence du polypeptide hétérologue correspondant à la protéine G du VRS, les acides
30 aminés phénylalanine correspondant aux positions 163, 165, 168 et/ou 170 de la séquence de la protéine G sont remplacés par un acide aminé polaire, en particulier la sérine.

Cette modification peut être associée aux mutations précédemment citées. Un tel polypeptide peut notamment présenter la séquence ID n° 5.

Lors de la mise en oeuvre du procédé, la suppression de la région hydrophobique située en amont de la boucle critique formée par le pont disulfure entre les acides aminés cystéine en positions 176 et 182, permet à la protéine recombinante de mieux traverser la membrane bactérienne et d'exposer correctement la partie immunodominante à la surface membranaire.

Selon encore un autre aspect de l'invention, dans la séquence peptidique correspondant à la protéine G du VRS, la séquence comprise entre les acides aminés numérotés 162 et 170 est déletée.

Plus particulièrement la séquence du peptide hétérologue exprimée dans la bactérie peut comporter la séquence ID n° 6.

L'invention comprend également une bactérie exprimant un peptide ou une protéine, susceptibles d'être obtenus par le procédé décrit dans la présente demande. Ladite bactérie peut être utilisée vivante ou tuée.

Les polypeptides ou les bactéries présentant une ou plusieurs des caractéristiques ci-dessus sont utiles à titre de médicament.

L'invention comprend des compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent un polypeptide ou une bactérie selon l'invention en mélange avec des adjuvants pharmaceutiquement acceptables.

Le vaccin oral à base de vecteur vivant doit comprendre la protéine modifiée qui présente la conformation optimale pour induire la meilleure protection contre le VRS.

C'est pourquoi la présente invention a également pour objet une application d'une telle composition pharmaceutique à la préparation d'un vaccin par voie orale destiné à prévenir les infections provoquées par le virus respiratoire syncytial.

Enfin, l'invention a pour objet les séquences nucléotidiques codant pour un peptide recombinant analogue d'un peptide naturel tel que décrit précédemment ; ces séquences peuvent comporter en outre des éléments assurant l'expression du peptide dans une ou plusieurs cellules hôtes spécifiques. Ces éléments permettent de cibler les cellules dans lesquelles

la construction va s'exprimer lors de son administration à un mammifère, humain ou animal. Il peut s'agir de constructions d'ADN ou d'ARN, qui seront de préférence incorporées dans un vecteur. Des vecteurs appropriés sont notamment des plasmides ou des virus du type Adenovirus, qui pourront être formulés dans des compositions pharmaceutiques avec des excipients acceptables.

Selon l'un de ses aspects, l'invention a pour objet des séquences nucléotidiques codant pour un polypeptide porté par une séquence peptidique comprise entre les résidus aminoacides 130 et 230 de la protéine G du virus respiratoire ou pour un polypeptide présentant au moins 80 % d'homologie avec ladite séquence peptidique, et comportant en outre les moyens permettant l'expression du polypeptide à la surface de la membrane d'une bactérie non pathogène du genre *Staphylococcus*.

Une séquence d'ADN qui comprend

- une séquence signal de sécrétion fonctionnelle,
- une séquence d'ADN codant pour un peptide recombinant analogue d'un peptide naturel, la séquence de peptide recombinant présentant au moins une modification dans la région hydrophobe non transmembranaire du peptide naturel,

fait partie de l'invention.

Le procédé selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- a. transformer les cellules hôtes avec une construction d'ADN recombinant renfermant une séquence signal qui est liée de manière opérationnelle à un gène structurel, et que ce dernier soit modifié de telle sorte que le produit recombinant peut être translocaté à travers la membrane de la cellule hôte ;
- b. fermenter ladite cellule hôte pour exprimer le produit recombinant ;
- c. récupérer les protéines extracellulaires, sécrétées par les cellules transformées par les constructions.

L'invention comprend également une cellule recombinante qui contient une séquence d'ADN ou une construction telle que définie précédemment.

Cette cellule hôte peut être une bactérie, Gram⁺ ou Gram⁻, une
5 cellule de levure ou une cellule de mammifère.

Des bactéries particulièrement adaptées sont choisies dans le groupe comprenant *Escherichia coli*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*.

La séquence d'ADN peut être intégrée dans le chromosome de la
10 bactérie, Gram positif ou Gram négatif.

Cette construction d'ADN recombinant peut renfermer le gène codant pour la protéine G de l'acide aminé 130 à 230 du VRS humain sous-groupe A fusionnée en amont et/ou en aval de celle du sous-groupe B.

Un type de construction peut être réalisé avec le gène codant pour
15 la protéine de l'acide aminé 130 à 230 du VRS bovin appartenant au sous-groupe A, ou sous sous-groupe B.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

20

- Figure 1 : Construction par assemblage de gènes du plasmide pRIT28G2av ;
- Figure 2 : 1) Construction du gène G2 substitué par des résidus serine ;
2) Construction du gène G2 délété des résidus 162 à 170 ;
- Figure 3 : Schéma des constructions de vecteurs navettes, en haut
25 pSE'mlp18BBXM, en (A) vecteur pSE'G2BBXM ; (B) vecteur pSE'G2subBBXM ;
et (C) vecteur pSE'G2delBBXM ;
- Figure 4 : Analyse par cytométrie de flux des protéines recombinantes de surface ;
- Figure 5 : Analyse par SDS-Page des protéines extraites de la membrane
30 de *S. xylosus* recombinant ;
- Figure 6 : Schéma du principe de construction des vecteurs de sécrétion à partir des vecteurs navettes respectifs pSE'G2subBBXM et pSE'G2delBBXM dont les descriptions sont détaillées dans l'exemple 4. Sont illustrés les produits sécrétés à partir du milieu de culture de *S. xylosus* portant des
35 vecteurs dont le codon Stop (T) a été inséré en amont de la région d'ancrage membranaire XM ;

- Figure 7 : Analyse par SDS-Page et immunoblot des protéines de fusion secrétées par *S. xylosus* ;
- Figure 8 : Analyse par cytométrie de flux des protéines secrétées par *S. xylosus* portant différents vecteurs navettes.

5

EXEMPLES

EXEMPLE 1 :

1) Construction de G2 par assemblage de gènes synthétiques :

10 Le gène codant pour la région en amino-acides 130-230 de la glycoprotéine G du virus RS, nommé G2, où nous avons en plus changé deux résidus Cys en position 173 et 186 en Ser par rapport à la séquence d'origine, est obtenu par les techniques d'assemblage de gènes en phase solide (Stahl S. et col., 1993. BioTechniques, 14:424-434). La séquence des
15 oligonucléotides a été optimisée en combinant les codons usuels de bactéries telles que *E. coli* et *Staphylococcus*.

Les oligonucléotides ont été synthétisés par la chimie des phosphoramidites sur le synthétiseur d'ADN automatique (Gene Assembler Plus, Pharmacia Biotech) selon les recommandations du constructeur. Les
20 oligonucléotides à fixer en phase solide sont biotinylés en extrémité 5' par le réactif Biotin-on phosphoramidite (Clontech). Les autres oligonucléotides sont phosphorylés en 5' par le réactif Phosphate-on amidite (Clontech) selon le protocole de Clontech. Les oligonucléotides sont déprotégés et sont purifiés selon les recommandations de Pharmacia. Les
25 oligonucléotides biotinylés sont purifiés par chromatographie liquide sur phase réverse (colonne PEP RPC, Pharmacia).

Le gène est assemblé en deux parties : G2am (amont) de l'aa 130 à 177 avec deux sites de restriction BamHI et PstI en 5' et 3' du gène, G2av (aval) de l'aa 177 à 230 avec deux sites de restriction PstI et BamHI en 5' et
30 en 3' du gène. Le gène G2 est reconstitué en ligaturant les deux fragments G2am et G2av par le site PstI.

a) Assemblage de gène de G2am (FIGURE 1) :

Dans un micro tube, deux oligonucléotides complémentaires dont
35 l'un est biotinylé en 5' : TH1B = 5'-Biotin-CCGGATCCT ATGACCGTGA A-3'

et TH2 = 5'-GTTTTTGGTT TTCACGGTCA TAGGATCCGG-3' sont hybridés et immobilisés sur des billes magnétiques couplées à la streptavidine (Dyna, Oslo, Norway). Le double brin immobilisé comprend un site de restriction BamHI et le brin complémentaire à celui qui est biotinylé possède 6 à 15
5 nucléotides de dépassement de son côté 5' (phosphorylé) permettant à l'oligonucléotide suivant de venir s'hybrider. L'hybridation de ce dernier oligonucléotide est effectuée en élevant la température du milieu à 70°C pour éviter la formation de structures secondaires. La ligature est faite en ajoutant de la T4 DNA ligase (Gibco BRL). Ainsi le gène est construit
10 successivement en prenant la précaution à chaque cycle de rincer le support solide afin d'éliminer l'excès d'oligonucléotides non liés avant d'ajouter l'oligonucléotide suivant. Le dernier double brin ligaturé contient un site de restriction PstI.

Le double brin est ensuite libéré de son support solide en le digérant
15 avec les enzymes de restrictions BamHI et PstI puis ligaturé dans le vecteur de clonage et de séquençage pRIT28 (Hultman et col., 1988, Nucleosides Nucleotides 7:629-638) digéré par les mêmes enzymes : le vecteur résultant est pRIT28G2am de taille 3067pb. La séquence nucléotique de G2am est déterminée par séquençage d'ADN sur le
20 séquenceur automatique ABI, selon les recommandations du constructeur (Applied Biosystem).

b) Assemblage de gène de G2av (FIGURE 1) :

De la même manière le gène G2av est assemblé en phase solide sur
25 billes magnétiques par les deux premiers oligonucléotides complémentaires dont l'un est biotinylé en 5': TH13B = (5'-Biotin-TGTGAAGCTT AGTCGACCGG TTIG-3') et TH12 = (5'-GCCGACCACC AAACCGGTCG ACTAAGCTTC ACA-3'), ainsi de suite. Le double brin est libéré du support solide par digestion enzymatique successivement par PstI et
30 HindIII, cloné dans pRIT28 : le vecteur résultant est nommé pRIT28G2av de taille 3091pb. La séquence nucléotique de G2av est déterminée par séquençage d'ADN sur le séquenceur automatique ABI, selon les recommandations du constructeur (Applied Biosystem).

c) Construction du gène G2 = G2am + G2av :

Les deux fragments G2am et G2av sont ligaturés par le site de restriction PstI et le gène constitué est cloné dans pRIT28 par les sites BamHI en 5' et HindIII en 3': le vecteur résultant est nommé pRIT28G2 de taille 3220pb. La séquence nucléotique de G2 est déterminée par séquençage d'ADN sur le séquenceur automatique ABI, selon les recommandations du constructeur (Applied Biosystem). Le fragment G2 est digéré par BamHI et HindIII et cloné dans le vecteur navette : pSE'G2BBXM (7666 pb) (FIGURE 3).

10 Liste des oligonucléotides nécessaires pour l'assemblage de gènes G2:

BamHI

TH1B (20mer) : 5'-Biotin-CCGGATCCT ATGACCGTGA A-3'

BamHI

15 TH2 (30mer) : 5'-GTTTTTGGTT TTCACGGTCA TAGGATCCGG-3'

TH3 (28mer) : 5'-AACCAAAAAC ACCACGACCA CCCAGACC-3'

TH4 (31mer) : 5'-GTTTGCTCGG CTGGGTCTGG GTGGTCGTGG T-3'

TH5 (31mer) : 5'-CAGCCGAGCA AACCGACCAC CAAACAGCGTC-3'

TH6 (29mer) : 5'-CGGTTTGTTT TGACGCTGTT TGGTGGTCG-3'

20 TH7 (29mer) : 5'-AGAACAAACC GCCGAACAAA CCGAACAAC-3'

TH8 (34mer) : 5'-CTTCGAAATG GAAATCGTTG TTCGGTTTGT TCCGG-3'

TH9 (27mer) : 5'-GATTTCATT TCGAAGTGTT CAACTTC-3'

Pst I

TH10 (33mer) : 5'-TGCTGCAGAT GCTGCTCGGC ACGAAGTTGA ACA-3'

25

Pst I

TH11 (22mer) : 5'-GTGCCGAGCA GCATCTGCAG CA-3'

HindIII

TH12 (33mer) : 5'-GCCGACCACC AAACCGGTCG ACT'AAGCTTC ACA-3'

HindIII

TH13B (19mer) : 5'-Biotin-CCCTGTGAAG CTTGGTTTG-3'

TH14 (32mer) : 5'-CATAAACCGC AGACCACCAA ACCGAAAGAA GT-3'

TH15 (32mer) : 5'-GTGGTCGGCA CTTCTTTCGG TTTGGTGGTC TG-3'

5 TH16 (31mer) : 5'-AAAACCGACC TTCAAAACCA CCAAAAAAGA T-3'

TH17 (31mer) : 5'-CGGTTTATGA TCTTTTTTGG TGGTTTTGAA G-3'

TH18(30mer) : 5'-GGGCAAAAAA ACCACGACCA AACCGACCAA-3'

TH19 (31mer) : 5'-GTCGGTTTTT TGGTCGGTTT GGTCTGGTT T-3'

TH20 (34mer) : 5'-GGGCGATCAG CAAACGTATC CCGAACAAAA AACG-3'

10 TH21 (33mer) : 5'-TTTTGCCCGG TTTTGTTC GGGATACGTT TGC-3'

Pst I

TH22(25mer) : 5'-ATC TGCAGCAACA ACCCGACCTG CT-3'

Pst I

TH23 (34mer) : 5'-TGATCGCCCA GCAGGTCGGG TTGTTCTGCAGAT-3'

15

II) Construction de G2sub par mutagenèse dirigée :

Le fragment de gène où les quatre résidus Phenylalanine en position 163, 165, 168 et 170 sont remplacés par des Sérines, est généré par amplification génique (PCR), à partir du gène G2 inséré dans le vecteur

20 pRIT28, en utilisant comme couples d'amorces RIT27/TNG73 et RIT28/TNG72 (voir FIGURE 2.(1)). Les amorces TNG72 et TNG73 sont complémentaires d'une région de 19 nucléotides renfermant trois des quatres Phénylalanine :

Rit27 : 5'-GCTICCGGCT CGTATGTTGT GTG-3'

25 Rit28 : 5'-AAAGGGGGAT GTGCTGCAAG GCG-3'

TNG72 5'- C CAT TCC GAA GTG TCC AAC TCC GTG CCG AGC AG-3'

TNG73 3'- GC TTG CTA AGG GTA AGG CTT CAC AGG TTG-5'

D'une part, l'amorce TNG73 introduit les trois premières mutations (TTC en TCC) sur le fragment en amont amplifié avec RIT27. D'autre part

30 l'amorce TNG72 introduit les trois dernières mutations (TTC en TCC) sur le fragment en aval amplifié avec RIT28. Cinq cycles de températures (96 °c, 15 sec; 50 °c, 1 min; 72 °c, 1 min) suivis de vingt cycles (96 °c, 15 sec; 60 °c, 15 sec; 72 °c, 15 sec) Les deux fragments amplifiés sont mélangés dans un

seul tube dilué dans du tampon de PCR sans amorces et la réaction d'extension est faite en cinq cycles de températures (96 °c, 15 sec; 54 °c, 30 sec; 72 °c, 1 min). Le produit d'extension est dilué à 1/100 dans du tampon PCR contenant les amorces RIT27 et RIT28 et l'amplification génique est faite en 30 cycles de températures (96 °c, 15 sec; 54 °c, 15 sec; 72 °c, 30 sec). Le fragment est ensuite digéré avec les enzymes de restrictions BamHI/HindIII et cloné dans le vecteur pRIT28 digéré par les mêmes enzymes: pRIT28G2sub. La séquence nucléotidique de G2Sub est déterminée par séquençage d'ADN sur l'appareil de séquenceur automatique ABI, selon les recommandations du constructeur (Applied Biosystem). Le fragment G2sub est digéré par BamHI et HindIII et cloné dans le vecteur navette : pSE'G2subBBXM (7666 pb)(FIGURE 3).

III) Construction de G_{2del} : (voir FIGURE 2.(2))

15 De la même manière, le fragment de gène G2 délété de la partie renfermant les 4 résidus Phénylalanine de l'aa 162 à l'aa 170 est généré par PCR en deux fragments : en amont avec les amorces RIT27/TH48 d'une part et en aval avec RIT28/TH11 d'autre part. Les amorces TH11 et TH48 sont complémentaires de 13 nucléotides.

20 TH11 5'-GTCCGAGCA GCATCTGCAG CA-3'
3'-GGCTTGTTC GGCTTGTTC CACGGCTCGT CGT-5' = TH48

Cinq cycles de températures (96 °c, 15 sec; 52 °c, 1 min; 72 °c, 1 min) suivis de vingt cycles (96 °c, 15 sec; 60 °c, 15 sec; 72 °c, 15 sec). Les deux fragments amplifiés sont mélangés dans un seul tube dilué dans du tampon de PCR sans amorce et la réaction d'extension est faite en cinq cycles de températures (96 °c, 15 sec; 42 °c, 30 sec; 72 °c, 1 min). Le produit d'extension est dilué à 1/100 dans du tampon PCR contenant les amorces RIT27 et RIT28 et l'amplification génique est faite en 30 cycles de températures (96 °c, 15 sec; 60 °c, 15 sec; 72 °c, 30 sec). Le fragment est ensuite digéré avec les enzymes de restrictions BamHI/HindIII et cloné

dans le vecteur prit28 digéré par les mêmes enzymes: pRIT28G2del. La séquence nucléotique de G2del est déterminée par séquençage d'ADN sur l'appareil de séquenceur automatique ABI, selon les recommandations du constructeur (Applied Biosystem). Le fragment G2del est digéré par BamHI et HindIII et cloné dans le vecteur navette : pSE'G2delBBXM (7639 pb)(FIGURE 3).

IV) Construction du vecteur navette :

Un linker d'oligonucléotides (5'-AGCTTGGCTG TTCCGCCATG GCTCGAG-3', avec le brin complémentaire) est inséré dans le site HindIII du plasmide pSZZmp18XM (Hansson et col, 1992, J.Bacteriol 174 : 4239-4245), créant ainsi deux sites de restriction supplémentaires NcoI et XhoI en aval du site HindIII du vecteur résultant pSZZmp18(XhoI)XM. Un fragment de gène codant 198 acides aminés, nommé BB, de la région de fixation du sérum albumine de la protéine G streptococcique (Nygren et col, 1988. J.Mol.Reconig., 1:69-74), est généré par PCR avec les amorces (1 = 5'-CCGAATTCAA GCTTAGATGC TCTAGCAAAA GCCAAG-3' et 2 = 5'-CCCCTGCAGT TAGGATCCCT CGAGAGGTAA TGCAGCTAAA ATTCATC-3') sur le template plasmidique pSPG1 (Guss et col, 1986,EMBO J., 5 : 1567-1575). Le fragment est digéré avec HindIII et XhoI et cloné en aval du site multiple de clonage mp18 du vecteur pSZZmp18(XhoI)XM; le vecteur résultant pSZZmp18(XhoI)BBXM est digéré par NotI et HindIII. Le fragment renfermant ZZ est remplacé par un autre fragment digéré par les mêmes enzymes de restriction du vecteur pE'mp18 (Sophia Hober, non publié). Le vecteur navette résultant est nommé pSE'mp18BBXM (FIGURE 3).

EXEMPLE 2 :

Extraction et analyse de protéines membranaires des *S. xylosus* recombinants :

Dans un erlenmeyer de 1 litre, on inocule 250 ml de milieu (7,5 g de TSB, 12,5 g de Yeast extract) contenant du Chloramphénicol (20 µg/ml) avec 5 ml de préculture (overnight) de *S. xylosus* transformé par le vecteur navette pSE'G2BBXM ou pSE'G2subBBXM ou pSE'G2delBBXM selon le

protocole de Götz et col, 1981, J Bacteriol., 145:74-81. Incuber sous agitation à température = 32° C pendant une durée de 6 heures. Centrifuger le milieu à 5000 rpm, 12 min et à température = 4° C. Le culot bactérien est resuspendu dans 40 ml de TST, on rajoute 200 µl de solution contenant de la lysostaphine (1 mg/ml) et 200 µl de lysozyme (50 mg/ml). Incuber pendant une heure à température = 37° C sous agitation modérée. Soniquer la solution pendant 2 min, avec l'appareil Vibra cell équipé d'une sonde dont la puissance est réglée à 7. Centrifuger à 13 500 rpm, pendant 20 min, à température = 4° C. Les protéines sont purifiées par affinité : le surnageant est passé sur colonne d'affinité HSA-Sépharose (Sérum Albumine Humaine). Après avoir rincé la colonne, les protéines sont éluées avec un tampon acide pH 2,7 et lyophilisées.

Les protéines sont séparées sur deux gels SDS-PAGE (12%) identiques avec les marqueurs de tailles moléculaires standard (Gibco BRL) précolorés. Un gel est coloré au Bleu de Coomassie. Le deuxième est transféré sur membrane Problot™ (Applied Biosystem) pour l'immunoblot avec l'anticorps spécifique anti-G1 (obtenu à partir du sérum de lapin immunisé avec le peptide G1(aa174-187) selon les protocoles courants d'immunisation). Voir Figure 5.

20

EXEMPLE 3 :

Analyse par Cytométrie de Flux (FACScan™) des protéines recombinantes à la surface de *S. xylosus* :

Les cultures des bactéries recombinantes *S. xylosus* sont faites comme décrit précédemment. Pour constituer une solution stock, on resuspend la bactérie dans une solution de PBS à 0,1% de Sodium Azide (p/v) à la concentration finale estimée par densité optique (600nm) égale à l'unité. On aliquote 30 µl de solution stock dans chaque puits cône d'une plaque de microtitres, on centrifuge à 550 g pendant 10 minutes à 4° C. On resuspend le culot bactérien dans un volume de 150 µl de solution de PBS contenant du sérum lapin polyclonal anti-G2 (titré 1/1 280 000) dilué

30

au 1/200ème, incubation pendant 30 minutes. On rince deux fois les cellules bactériennes avec du PBS et on incube dans 150 μ l d'une solution de PBS renfermant de l'anti-lapin FITC (Sigma) dilué au 1/100ème pendant une durée de 30 minutes. Après avoir rincé les cellules deux fois avec du tampon PBS, on resuspend dans un tube Falcon contenant 1 ml de tampon PBS-Paraformaldéhyde 1% (p/v). Les échantillons préparés sont analysés sur l'appareil FACScan™ (Becton Dickinson). La distribution de fluorescence de chaque suspension cellulaire est analysée par le logiciel LYSIS II™ et est représentée par des histogrammes de fluorescence. Voir Figure 4.

EXEMPLE 4 :

Modulation sécrétion-insertion en sécrétion :

A partir des différents vecteurs navettes, il est possible d'insérer des codons de terminaison en amont de la région codant pour l'ancrage membranaire XM, comme le montre la figure 6. Un site unique de restriction XhoI entre BB et XM a été utilisé pour insérer un double brin d'oligonucléotides codant pour trois codons terminaison (Ter) dans les deux sens d'orientation, avec introduction d'un site de restriction Aat II :

Aat II Ter Ter Ter -->
 5'-TC GAC GTC TAA TGA TAA TTA TCA TTA G-3'
 3'-G CAG ATT ACT ATT AAT AGT AAT CAG CT-5'
 <-- Ter Ter Ter

Les vecteurs pSE'G2subBBXM et pSE'G2delBBXM sont ainsi digérés par Xho I et sont ligaturés avec le double brin d'oligonucléotides préalablement phosphorylés en 5'. Les vecteurs résultants sont respectivement pSE'G2subBB[Ter]XM (7693 pb) et pSE'G2delBB [Ter]XM (7666 pb). La culture des *E.coli* ou des *S.xylosus* transformées respectivement avec ces deux vecteurs suivie d'une purification sur colonne d'affinité (HSA Sépharose) permet d'obtenir des protéines G2subBB et G2delBB. La figure 7 montre: en

A) le gel SDS-PAGE, la séparation des protéines secrétées à partir des *S.xylosus*, dans des conditions réduites, en 1 et en 2 représentent respectivement les protéines G2subBB et G2delBB à la taille attendue: 35,23 Kda et 34,28 Kda; en B) l'immunoblot des protéines montre que l'anticorps spécifique à la région G(aa174-187) ou G1 du VRS reconnaît bien les deux protéines secrétées. Très peu de dégradations protéolytiques ont été observées. De plus, l'analyse FACSCAN avec l'anticorps polyclonal anti-lapin, anti-BB a été réalisée sur les différents *S.xylosus*. La figure 8 montre que les spectres de *S.xylosus* portant des vecteurs navettes pSE'mp18BBXM, pSE'G2subBBXM et pSE'G2delBBXM sont déplacés dans l'axe de l'intensité de fluorescence vers la droite, c'est-à-dire vers la présence des antigènes hétérologues à la surface de la bactérie. Alors que les spectres de *S.xylosus* portant des vecteurs navettes pSE'G2subBBTerXM et pSE'G2delBBTerXM n'y sont pas déplacés, ceci indique que les antigènes hétérologues sont absents à la surface de la bactérie et que l'on les a retrouvés et purifiés à partir du milieu de culture.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: PIERRE FABRE MEDICAMENT
- (B) RUE: 45 PLACE ABEL GANCE
- (C) VILLE: BOULOGNE
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92100

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PRODUCTION DE PEPTIDES ANALOGUES DE PEPTIDES HYDROPHOBES, PEPTIDE RECOMBINANT, SEQUENCE D'ADN CORRESPONDANTE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 9413307
- (B) DATE DE DEPOT: 07-NOV-1994

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 303 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..303

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys 1 5 10 15	48
CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC AAC Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn 20 25 30	96
GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser 35 40 45	144
AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys 50 55 60	192
CCG GGC AAA AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys 65 70 75 80	240
ACC ACC AAA AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val 85 90 95	288
CCG ACC ACC AAA CCA Pro Thr Thr Lys Pro 100	303

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 303 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMPLACEMENT: 1..303

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

[illegible]

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 303 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1..303

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA	48
Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys	
1 5 10 15	
CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC AAC	96
Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn	
20 25 30	
GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC TGC AGC	144
Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys Ser	
35 40 45	
AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA	192
Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys	
50 55 60	
CCG GGC AAA AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA	240
Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys	
65 70 75 80	
ACC ACC AAA AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG	288
Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val	
85 90 95	
CCG ACC ACC AAA CCA	303
Pro Thr Thr Lys Pro	
100	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 303 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1..303

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

[illegible]

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 303 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1..303

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA	48
Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys	
1 5 10 15	
CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC AAC	96
Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn	
20 25 30	
GAT TCC CAT TCC GAA GTG TCC AAC TCC GTG CCG AGC AGC ATC TGC AGC	144
Asp Ser His Ser Glu Val Ser Asn Ser Val Pro Ser Ser Ile Cys Ser	
35 40 45	
AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA	192
Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys	
50 55 60	
CCG GGC AAA AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA	240
Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys	
65 70 75 80	
ACC ACC AAA AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG	288
Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val	
85 90 95	
CCG ACC ACC AAA CCA	303
Pro Thr Thr Lys Pro	
100	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 276 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1..276

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA 48
Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys
1 5 10 15

CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC AAC 96
Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn
20 25 30

GTG CCG AGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC 144
Val Pro Ser Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser
35 40 45

AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC AAA AAA ACC ACG ACC AAA CCG 192
Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro
50 55 60

ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA ACC ACC AAA AAA GAT CAT AAA CCG CAG 240
Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln
65 70 75 80

ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCA 276
Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro
85 90

LEGENDE DES FIGURES

Figure 5 :

A) Coloration au bleu de Comassie : Gel SDS-Page des protéines de fusion extraites de membrane bactérienne et purifiées par affinité sur colonne Albumine des différents constructions :

- Puits HW : Marqueurs de taille moléculaire (en Kda).
- puits 1 : *S.xylosus* [pSE'G2BBXM].
- puits 2 : *S.xylosus* [pSE'G2subBBXM].
- puits 3 : *S.xylosus* [pSE'G2delBBXM].

B) Immunoblot des protéines de fusion extraites de membrane bactérienne et purifiées par affinité sur colonne Albumine des différents constructions avec anticorps polyclonal apin anti-G1.

- Puits HW : Marqueurs de taille moléculaire précolorés (en Kda).
- puits 1 : *S.xylosus* [pSE'G2BBXM].
- puits 2 : *S.xylosus* [pSE'G2subBBXM].
- puits 3 : *S.xylosus* [pSE'G2delBBXM].

Figure 7 :

A) Coloration au bleu de Comassie : Gel SDS-Page des protéines de fusion secrétées et purifiées par affinité sur colonne Albumine des différentes constructions:

- puits 1 : *S.xylosus* [pSE'G2delBB] (34,28 Kda).
- puits 2 : *S.xylosus* [pSE'G2subBB] (35,23 Kda).
- puits HW : Marqueurs de taille moléculaire (en Kda).

B) Immunoblot des protéines de fusion secrétées et purifiées par affinité sur colonne Albumine des différentes constructions avec anticorps polyclonal lapin anti-G1 (VRS).

- puits 1 : *S.xylosus* [pSE'G2delBB] (34,28 Kda).
- puits 2 : *S.xylosus* [pSE'G2subBB] (35,23 Kda).
- puits HW : Marqueurs de taille moléculaire précolorés (en Kda).

REVENDICATIONS

1. Procédé de sécrétion d'un peptide recombinant biologiquement actif, analogue d'un peptide naturel présentant au moins une région hydrophobe, caractérisé en ce qu'on cultive des cellules transformées par une construction d'acides nucléiques comportant - des éléments assurant l'expression et la sécrétion dudit peptide par la cellule, et

- une séquence codant pour un peptide dont la séquence en acides aminés diffère de la séquence du peptide naturel par au moins une modification dans une région hydrophobe non transmembranaire du peptide, et en ce que l'on récupère le peptide et/ou les cellules portant ledit peptide recombinant.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'au moins un acide aminé hydrophobe de la séquence du peptide naturel est remplacé par un acide aminé non hydrophobe.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'au moins un acide aminé hydrophobe est délété de la séquence du peptide naturel.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'acide aminé hydrophobe est choisi dans le groupe suivant : Tryptophane, Phénylalanine, Proline, Valine, Alanine, Isoleucine, Leucine et Méthionine.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la construction d'ADN comprend une séquence signal de sécrétion liée de manière opérationnelle à la séquence d'ADN codant pour le peptide recombinant, et assurant la translocation dudit peptide et sa sécrétion extracellulaire.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la construction d'ADN comprend une séquence signal liée de manière opérationnelle à la séquence d'ADN codant pour ledit peptide et permettant la translocation du peptide à travers la membrane de la cellule hôte et son ancrage membranaire.

7. Peptide recombinant susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il diffère du peptide naturel par au moins une modification dans la région hydrophobe du peptide naturel.
- 5 8. Peptide recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est ancré à la surface de la cellule hôte.
9. Peptide recombinant selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un analogue d'une protéine de structure du VRS ou d'un fragment d'une telle protéine.
- 10 10. Peptide recombinant selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence analogue de la protéine G du VRS, sous groupe A ou B.
11. Peptide recombinant selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence analogue de la séquence comprise entre les résidus 130 et 230 de la protéine G du VRS.
- 15 12. Peptide recombinant selon l'une des revendications 7 à 11, caractérisé en ce qu'il présente l'une des séquences ID n° 1, n° 2, n° 3, n° 4, n° 5 ou n° 6.
13. Séquence nucléotidique codant pour un peptide selon l'une des revendications 7 à 12.
- 20 14. Séquence nucléotidique selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre des éléments assurant l'expression du peptide dans une ou plusieurs cellules hôtes spécifiques.
15. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisée en ce qu'il s'agit d'ADN.
- 25 16. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisée en ce qu'il s'agit d'ARN.
17. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 13 à 16.
- 30 18. Composition pharmaceutique destinée à être administrée à un mammifère pour provoquer la production in situ d'un peptide, caractérisée en ce qu'elle contient un vecteur d'expression selon la revendication 17.

19. Séquence d'ADN susceptible d'être utilisée dans le procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- une séquence signal de sécrétion fonctionnelle,
- une séquence d'ADN codant pour un peptide recombinant analogue d'un peptide naturel, la séquence de peptide recombinant présentant au moins une modification dans une région hydrophobe non transmembranaire du peptide naturel.

20. Cellule recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient une séquence d'ADN selon l'une des revendications 15 à 16 ou 19.

21. Cellule selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie Gram-négatif.

22. Cellule selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie Gram-positif.

23. Cellule selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de levure.

24. Cellule selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de mammifère.

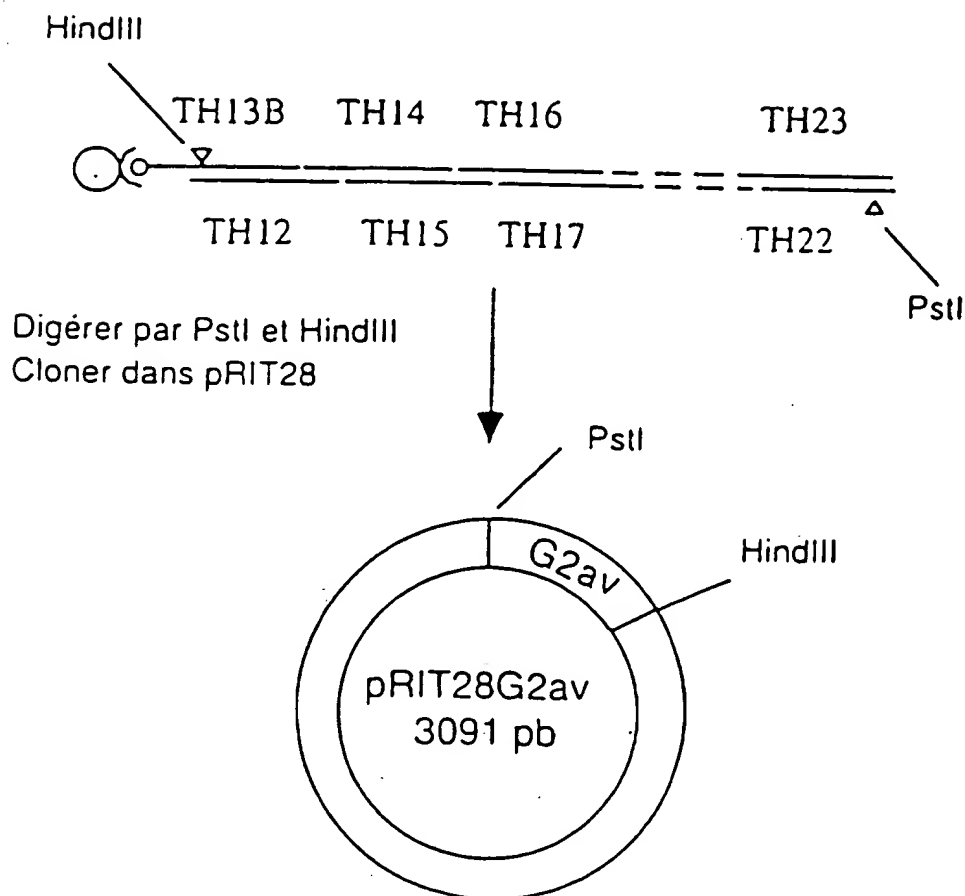
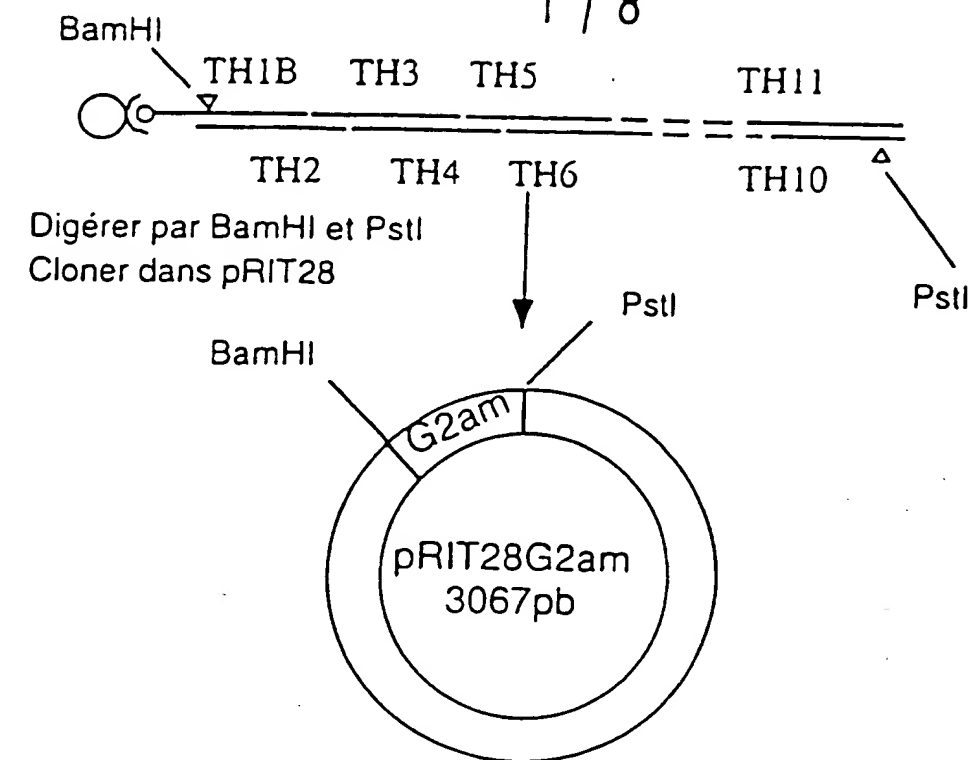
25. Bactérie selon l'une des revendications 22 ou 23, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi *Escherichia coli*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*.

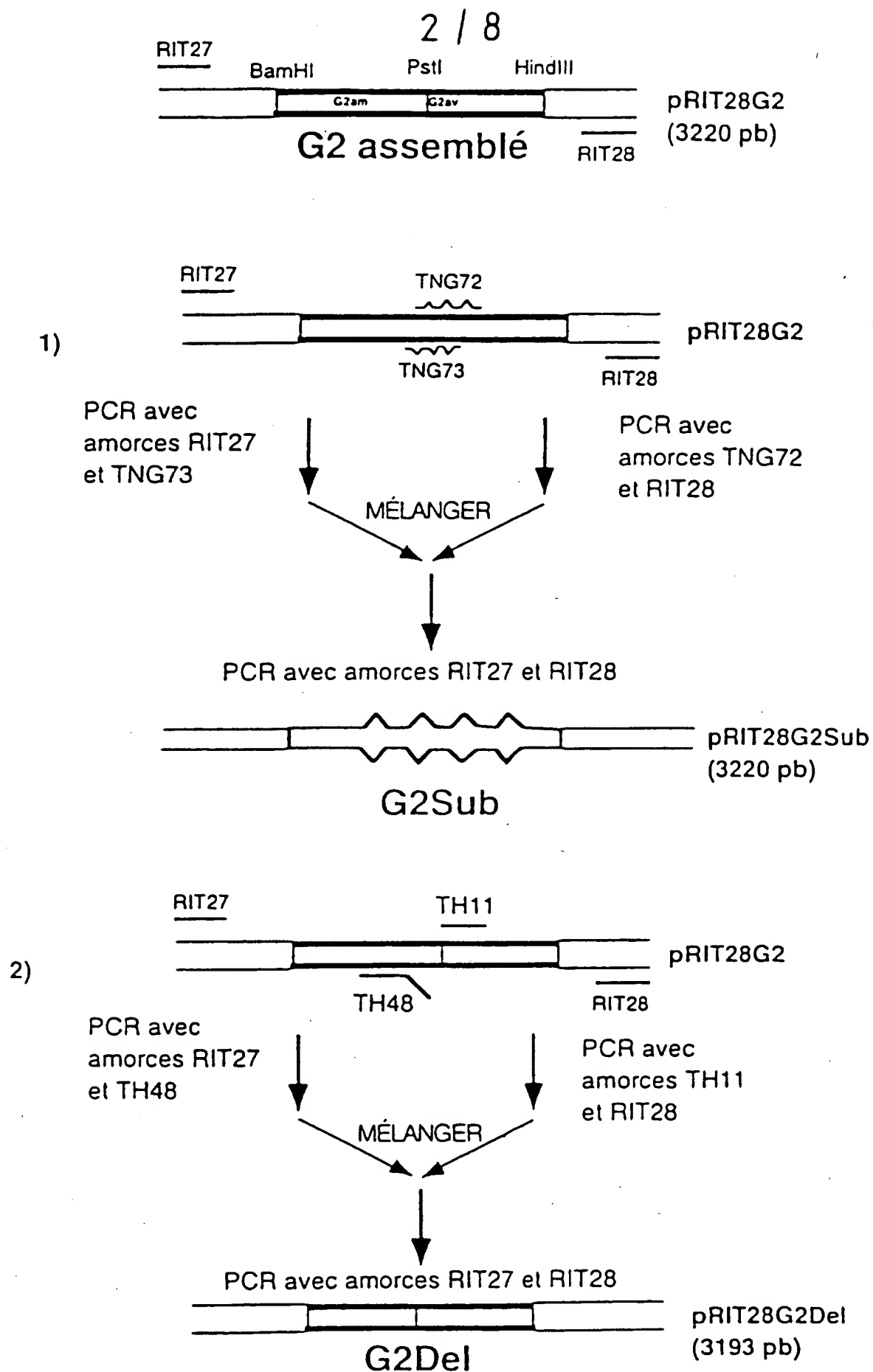
26. Bactérie Gram-négatif selon la revendication 21, caractérisée en ce que la séquence d'ADN recombinant, s'est intégrée dans le chromosome de l'hôte.

27. Bactérie Gram-positif selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle contient une séquence d'ADN recombinant, qui s'est intégrée dans le chromosome de l'hôte.

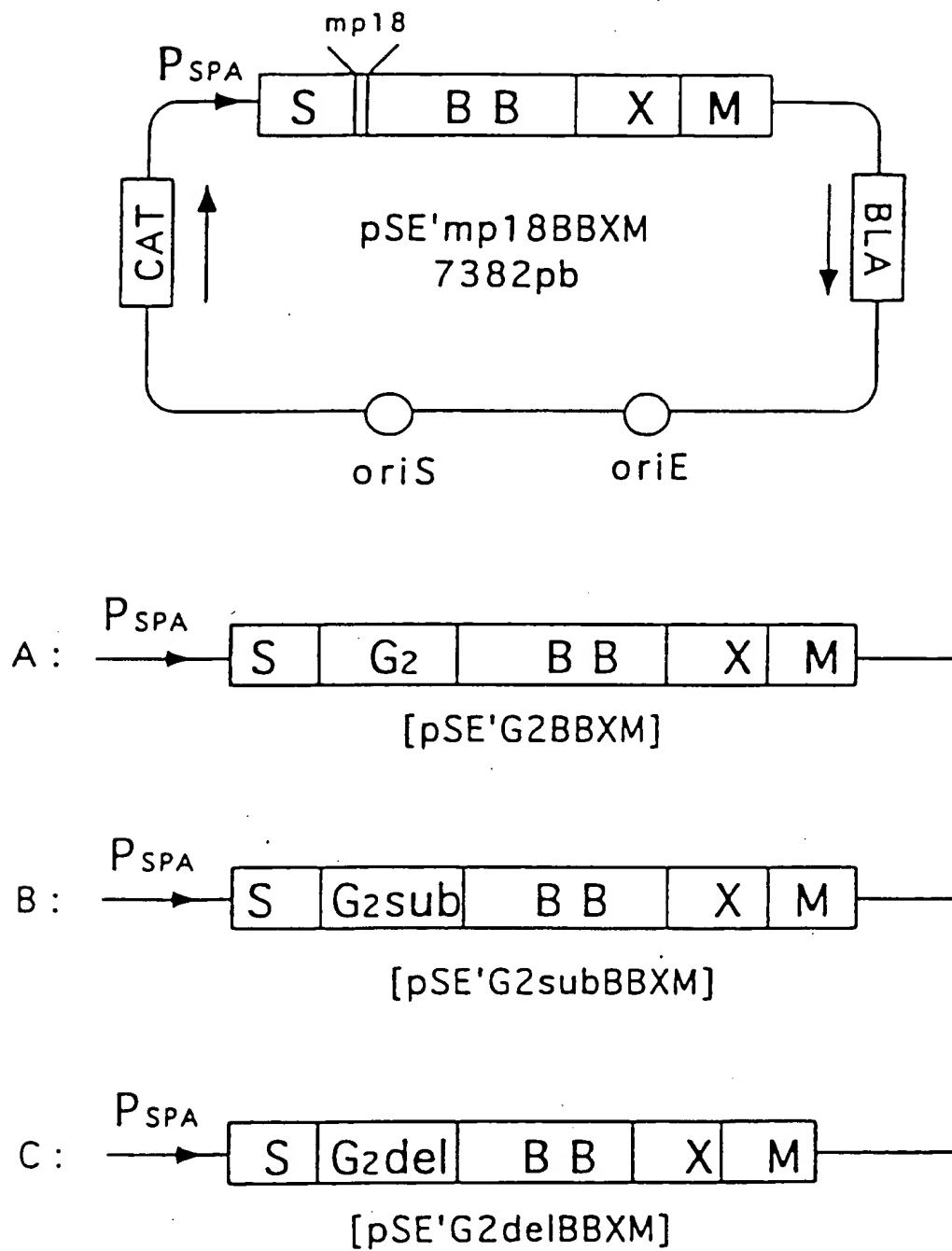
28. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient une cellule selon l'une des revendications 20 à 27.

1 / 8

FIG. 1

FIG. 2

3 / 8

FIG. 3

4 / 8

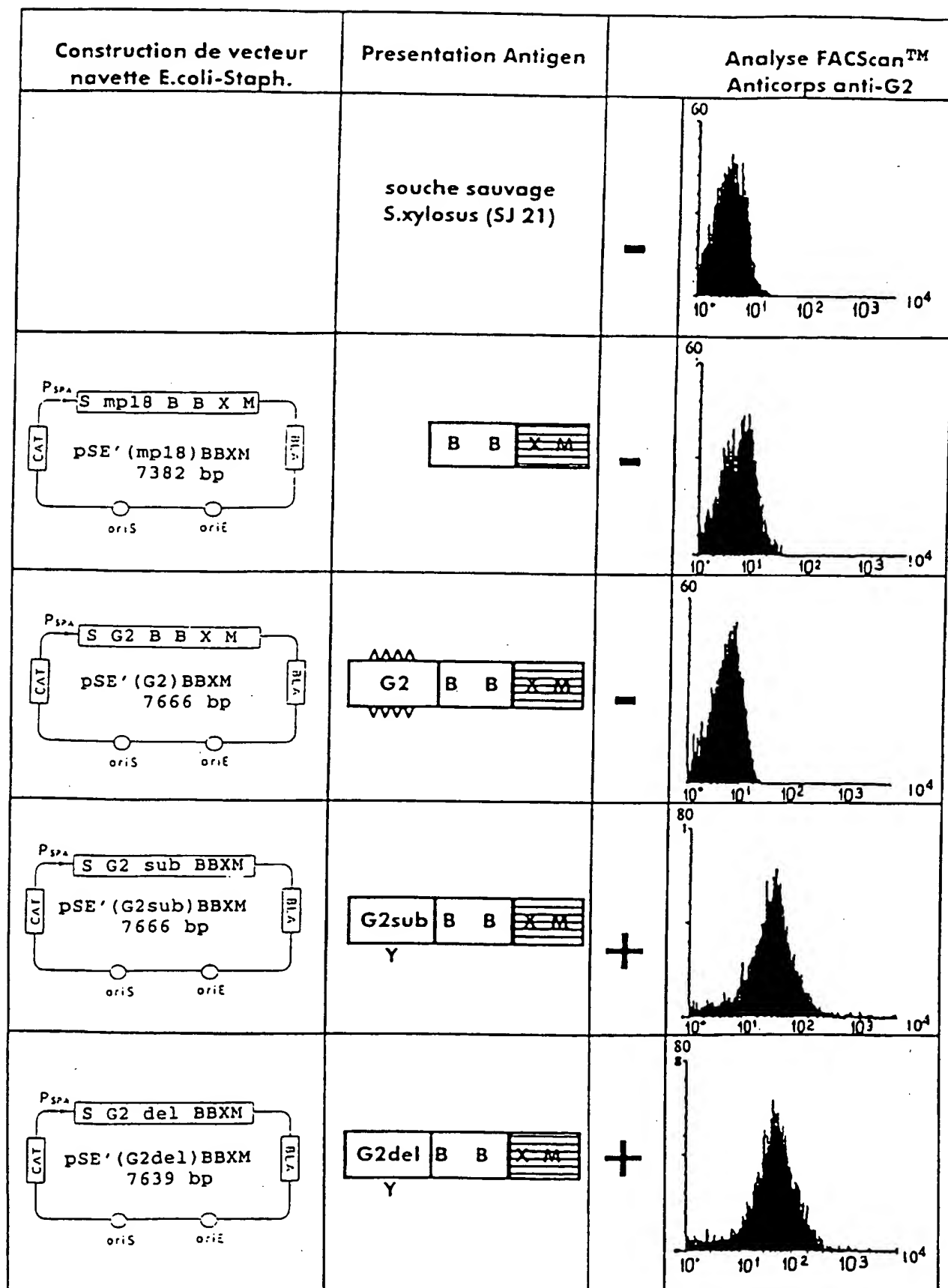
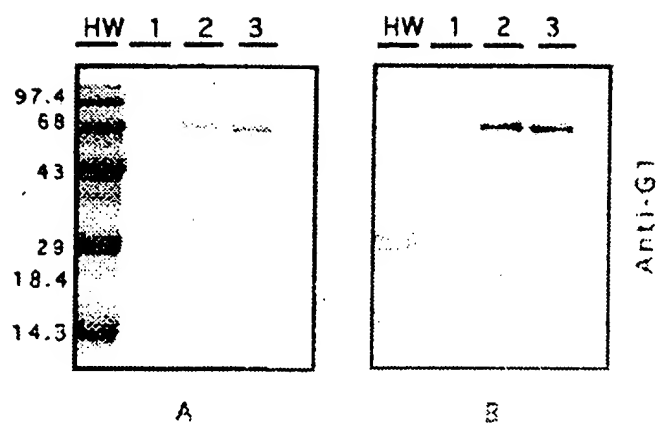


FIG. 4

FIG. 5

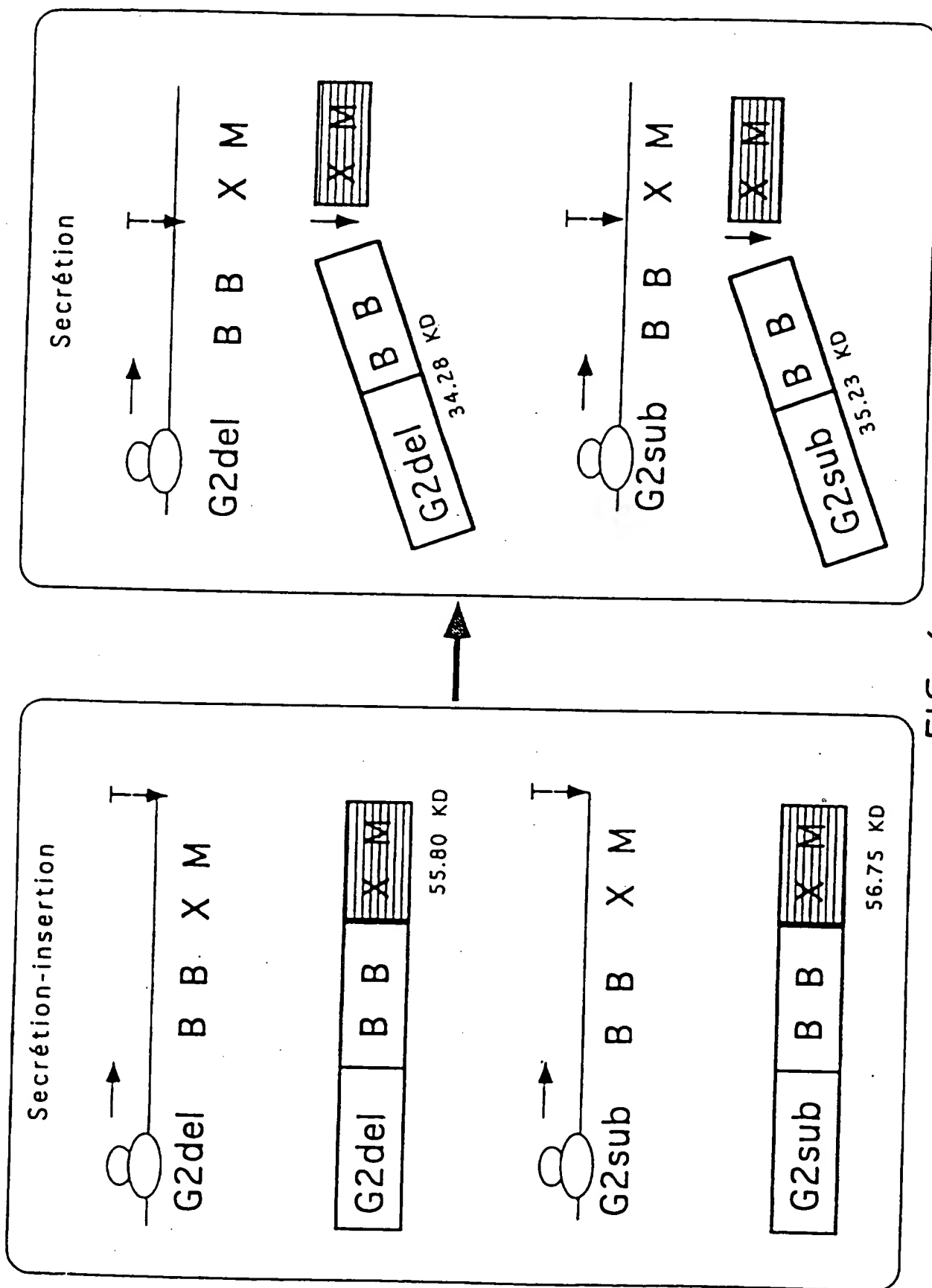
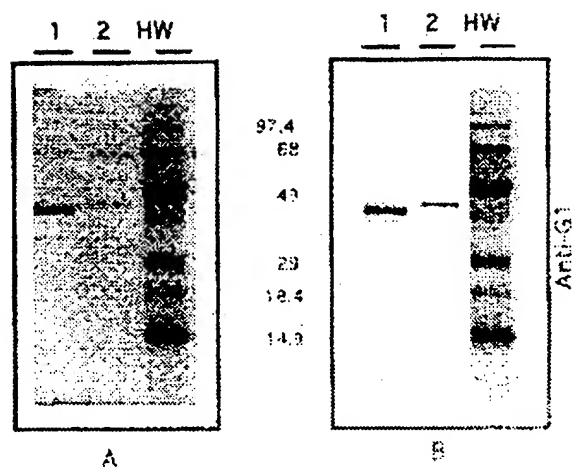


FIG. 6

7 / 8

FIG. 7

8 / 8

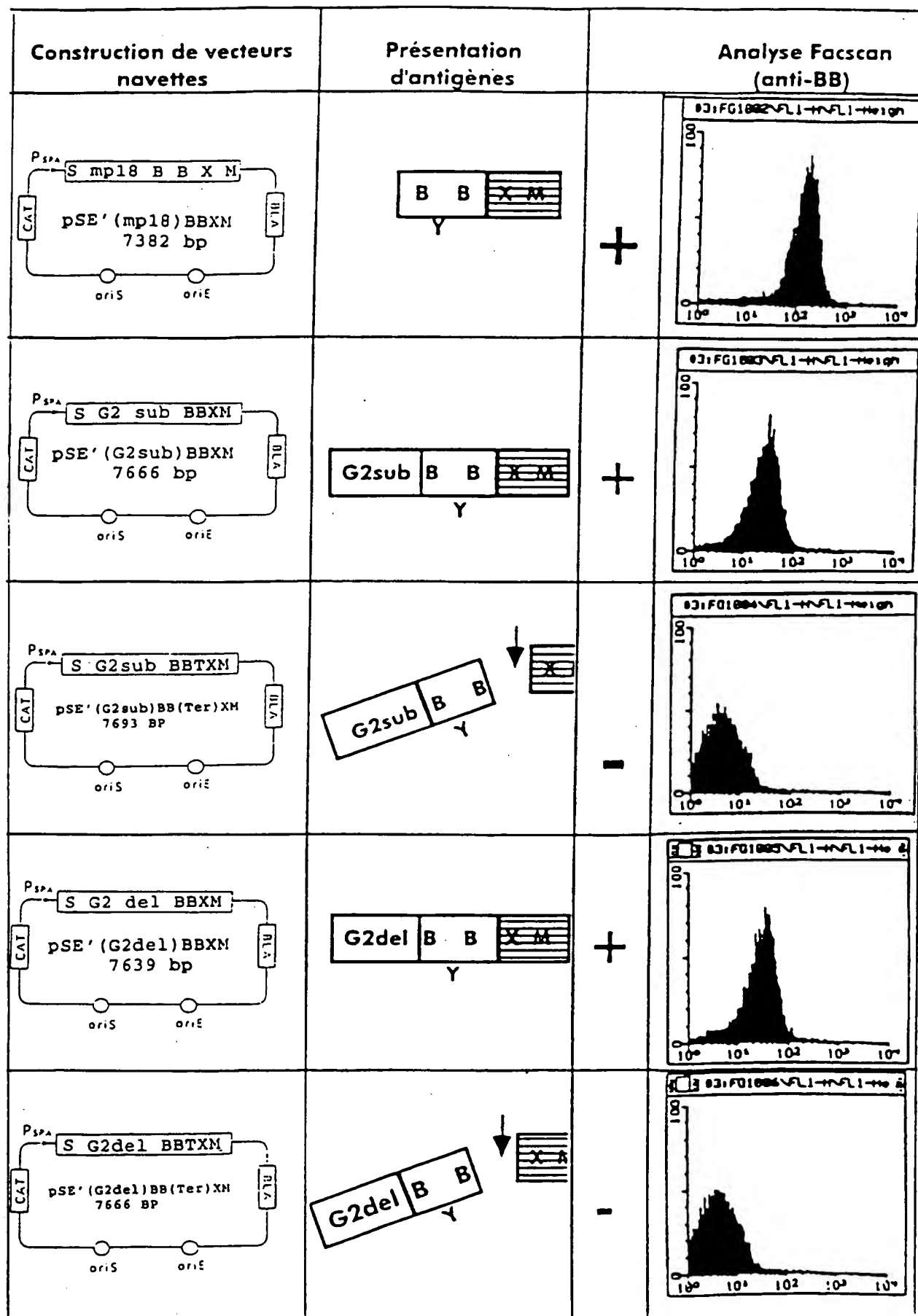


FIG 8

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/11 C07K14/135

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 230, no. 1, May 1995 pages 38-44, MURBY, M. ET AL. 'Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus' see the whole document ---	1-28
X	BIOTECHNOLOGY, vol. 10, April 1992 NEW YORK US, pages 435-439, RINAS, U. ET AL. 'Cysteine to serine substitutions in basic Fibroblast growth factor: effect on inclusion body formation and proteolytic susceptibility during in vitro refolding' see the whole document ---	1,2,7, 13,20, 21,25,26
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 1996

Date of mailing of the international search report

25.03.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,90 06953 (GENENTECH INC.) 28 June 1990 see the whole document ---	1-7, 13-20,24
A	EP,A,0 249 477 (IMMUNEX CORPORATION) 16 December 1987 see the whole document ---	1-7, 13-20,23
A	WO,A,89 02935 (PRAXIS BIOLOGICS, INC.) 6 April 1989 see the whole document ---	9
A	WO,A,87 04185 (UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA) 16 July 1987 see the whole document ---	9
X	GB,A,2 188 639 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO AKTIENGESELLSCHAFT) 7 October 1987 see page 3, line 48 - line 51; example C D ---	1
X	WO,A,87 04728 (CAMBRIDGE BIOSCIENCE CORPORATION) 13 August 1987 see page 8, line 20 - page 9, line 24; figure 21; example 6 -----	1

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9006953	28-06-90	AU-B- 638964	15-07-93
		AU-B- 4832690	10-07-90
		CA-A- 2006475	22-06-90
		EP-A- 0452364	23-10-91
		JP-T- 4502327	23-04-92

EP-A-0249477	16-12-87	AU-B- 7410987	07-01-88
		JP-A- 63068095	26-03-88
		ZA-A- 8704001	02-12-87

WO-A-8902935	06-04-89	US-A- 5223254	29-06-93
		AU-B- 636838	13-05-93
		AU-B- 2613388	18-04-89
		EP-A- 0390799	10-10-90
		JP-T- 3502687	20-06-91
		CA-A- 1336955	12-09-95

WO-A-8704185	16-07-87	AU-B- 605476	17-01-91
		AU-B- 6941287	28-07-87
		DE-D- 3689622	17-03-94
		DE-T- 3689622	16-06-94
		EP-A- 0290446	17-11-88
		US-A- 5149650	22-09-92

GB-A-2188639	07-10-87	US-A- 4925784	15-05-90
		AT-A,B 82487	15-05-95
		AU-B- 599091	12-07-90
		AU-B- 7103287	08-10-87
		BE-A- 1001973	02-05-90
		CH-A- 676004	30-11-90
		DE-A- 3711016	08-10-87
		DE-A- 3744825	22-06-89
		DE-A- 3744826	08-06-89
		DE-A- 3744827	24-05-89
		FR-A- 2606422	13-05-88
		JP-A- 62244393	24-10-87
		NL-A- 8700795	02-11-87
		SE-A- 8701413	05-10-87
		SU-A- 1644720	23-04-91

PCT/FR 95/01464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8704728	13-08-87	US-A- 4753873	28-06-88
		US-A- 4734362	29-03-88
		AT-T- 109513	15-08-94
		AT-T- 123063	15-06-95
		AU-B- 605477	17-01-91
		AU-B- 7022787	25-08-87
		AU-B- 601175	06-09-90
		AU-B- 7081987	25-08-87
		DE-D- 3750301	08-09-94
		DE-T- 3750301	09-03-95
		DE-D- 3751310	29-06-95
		DE-T- 3751310	15-02-96
		EP-A- 0233044	19-08-87
		EP-A- 0233045	19-08-87
		EP-A- 0596459	11-05-94
		ES-T- 2060594	01-12-94
		JP-T- 63502957	02-11-88
		JP-T- 63502958	02-11-88
		OA-A- 8687	31-03-89
		OA-A- 8762	31-03-89
		WO-A- 8704726	13-08-87

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/11 C07K14/135

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 230, no. 1, Mai 1995 pages 38-44, MURBY, M. ET AL. 'Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus' voir le document en entier ---	1-28
X	BIOTECHNOLOGY, vol. 10, Avril 1992 NEW YORK US, pages 435-439, RINAS, U. ET AL. 'Cysteine to serine substitutions in basic Fibroblast growth factor: effect on inclusion body formation and proteolytic susceptibility during in vitro refolding' voir le document en entier ---	1,2,7, 13,20, 21,25,26
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- 'Z' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 Février 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25.03.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cites, avec, le cas echant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
A	WO,A,90 06953 (GENENTECH INC.) 28 Juin 1990 voir le document en entier ---	1-7, 13-20,24
A	EP,A,0 249 477 (IMMUNEX CORPORATION) 16 Decembre 1987 voir le document en entier ---	1-7, 13-20,23
A	WO,A,89 02935 (PRAXIS BIOLOGICS, INC.) 6 Avril 1989 voir le document en entier ---	9
A	WO,A,87 04185 (UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA) 16 Juillet 1987 voir le document en entier ---	9
X	GB,A,2 188 639 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO AKTIENGESELLSCHAFT) 7 Octobre 1987 voir page 3, ligne 48 - ligne 51; exemple C D ---	1
X	WO,A,87 04728 (CAMBRIDGE BIOSCIENCE CORPORATION) 13 Août 1987 voir page 8, ligne 20 - page 9, ligne 24; figure 21; exemple 6 -----	1

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de breveu(s)	Date de publication
WO-A-9006953	28-06-90	AU-B- 638964	15-07-93
		AU-B- 4832690	10-07-90
		CA-A- 2006475	22-06-90
		EP-A- 0452364	23-10-91
		JP-T- 4502327	23-04-92

EP-A-0249477	16-12-87	AU-B- 7410987	07-01-88
		JP-A- 63068095	26-03-88
		ZA-A- 8704001	02-12-87

WO-A-8902935	06-04-89	US-A- 5223254	29-06-93
		AU-B- 636838	13-05-93
		AU-B- 2613388	18-04-89
		EP-A- 0390799	10-10-90
		JP-T- 3502687	20-06-91
		CA-A- 1336955	12-09-95

WO-A-8704185	16-07-87	AU-B- 605476	17-01-91
		AU-B- 6941287	28-07-87
		DE-D- 3689622	17-03-94
		DE-T- 3689622	16-06-94
		EP-A- 0290446	17-11-88
		US-A- 5149650	22-09-92

GB-A-2188639	07-10-87	US-A- 4925784	15-05-90
		AT-A,B 82487	15-05-95
		AU-B- 599091	12-07-90
		AU-B- 7103287	08-10-87
		BE-A- 1001973	02-05-90
		CH-A- 676004	30-11-90
		DE-A- 3711016	08-10-87
		DE-A- 3744825	22-06-89
		DE-A- 3744826	08-06-89
		DE-A- 3744827	24-05-89
		FR-A- 2606422	13-05-88
		JP-A- 62244393	24-10-87
		NL-A- 8700795	02-11-87
		SE-A- 8701413	05-10-87
		SU-A- 1644720	23-04-91

PCT/FR 95/01464

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8704728	13-08-87	US-A- 4753873	28-06-88
		US-A- 4734362	29-03-88
		AT-T- 109513	15-08-94
		AT-T- 123063	15-06-95
		AU-B- 605477	17-01-91
		AU-B- 7022787	25-08-87
		AU-B- 601175	06-09-90
		AU-B- 7081987	25-08-87
		DE-D- 3750301	08-09-94
		DE-T- 3750301	09-03-95
		DE-D- 3751310	29-06-95
		DE-T- 3751310	15-02-96
		EP-A- 0233044	19-08-87
		EP-A- 0233045	19-08-87
		EP-A- 0596459	11-05-94
		ES-T- 2060594	01-12-94
		JP-T- 63502957	02-11-88
		JP-T- 63502958	02-11-88
		OA-A- 8687	31-03-89
		OA-A- 8762	31-03-89
		WO-A- 8704726	13-08-87
